



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 11 723 A 1**

⑥① Int. Cl. 7:
C 12 N 9/02
C 12 N 15/53
C 12 N 15/70

⑳ Aktenzeichen: 100 11 723.6
㉔ Anmeldetag: 10. 3. 2000
㉕ Offenlegungstag: 13. 9. 2001

DE 100 11 723 A 1

㉑ **Anmelder:**
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉒ **Vertreter:**
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

㉓ **Erfinder:**
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE; Pleis,
Jürgen, Dr., 71679 Asperg, DE; Schwaneberg,
Ulrich, Dr., 71336 Waiblingen, DE; Schmitt, Jutta,
Dr., 70563 Stuttgart, DE; Fischer, Markus, 71638
Ludwigsburg, DE; Schmid, Rolf, Prof. Dr., 70329
Stuttgart, DE; Li, Qing-shan, Dr., Kyoto, JP

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ **Modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen**
⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen, Expressionskonstrukte und Vektoren, rekombinante Mikroorganismen, welche diese Vektoren enthalten sowie Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung terminal oder subterminal hydroxylierter aliphatischer Carbonsäuren.

DE 100 11 723 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen, Expressionskonstrukte und Vektoren, rekombinante Mikroorganismen, welche diese Vektoren enthalten sowie Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung terminal oder subterminal hydroxylierter aliphatischer Carbonsäuren.

Die Monooxygenase mit der Bezeichnung P450 BM-3 ist ein Cytochrom P450-Enzym aus *Bacillus megaterium* und besitzt eine ausgeprägte Sequenzhomologie mit P450-Enzymen aus Säugern (I). Aufgrund dieser Übereinstimmungen stellt P450 BM-3 ein ausgezeichnetes Modellsystem für diese Klasse von P450-Enzymen dar. P450 BM-3 hydroxyliert in erster Linie langkettige gesättigte Fettsäuren an ihrem ω -1-, ω -2- und ω -3-Kohlenstoffatom. Amide oder Alkoholanaloga und Epoxide langkettiger ungesättigter Fettsäuren werden ebenfalls umgesetzt (1-3). Die katalytische Aktivität für gesättigte Fettsäuren ist abhängig von der Kettenlänge, wobei das Kettenlängen-Optimum bei 14 bis 16 Kohlenstoffatomen liegt. Das Enzym zeigt keine katalytische Aktivität für Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12 Kohlenstoffatomen (1).

Zusammenfassung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Cytochrom P450-Monooxygenase-Mutanten bereitzustellen, welche im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ein modifiziertes Substratprofil zeigen. Insbesondere sollten neue Mutanten bereitgestellt werden, welche gesättigte aliphatische Carbonsäuren in anderer Kettenposition hydroxylieren und/oder eine modifizierte Substratspezifität besitzen. Vor allem sollten Mutanten bereitgestellt werden, welche katalytische Aktivität gegenüber aliphatischen Carbonsäuren mittlerer Kettenlänge, insbesondere mit einer Kettenlänge von 8 bis 12, wie z. B. 8 bis 10 Kohlenstoffatomen besitzen, und diese subterminal, vor allem an den Positionen ω -1, ω -2 und/oder ω -3 hydroxylieren.

Diese Aufgaben wurden überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung modifizierter Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche durch eine Kombination aus gerichteter Evolution und ortsspezifischer Mutagenese ihres Substratbindenden Bereichs im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Reaktivitätsmuster bei der terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren zeigen.

Ein "verändertes Substratprofil" bedeutet in Rahmen der vorliegenden Erfindung a) eine Verbesserung der Reaktivität der Mutante gegenüber zumindest einer hydroxylierbaren aliphatischen Carbonsäure oder einem hydroxylierbaren Carbonsäurederivat im Vergleich zum Wildtyp-Enzym und/oder b) eine Verschiebung der bevorzugten terminalen oder subterminalen (ω -1, ω -2, ω -3, ω -4, insbesondere ω -1 bis ω -3) Hydroxylierungsposition an wenigstens einer hydroxylierbaren Carbonsäure oder einem hydroxylierbaren Carbonsäurederivat.

Die erfindungsgemäßen Monooxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen der Enzymklasse E.C. 1.14.-.-., insbesondere aus der P450-Familie CYP102, und sind eukaryotischen oder prokaryotischen, insbesondere bakteriellen Ursprungs.

Eine besonders bevorzugte Gruppe von Mutanten ist abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO.: 2, welche wenigstens eine funktionale Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224 und 352-356, mit der Maßgabe, dass mehr als einer dieser Bereiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt; sowie funktionale Äquivalente dieser Mutanten.

Die jeweilige Mutation wird im Rahmen der vorliegenden Beschreibung im Aminosäure-Einbuchstabencode angegeben. Vor der Zahl, welche die Sequenzposition der Mutation bezeichnet, ist die ursprüngliche Aminosäure, nach der Zahl die modifizierte Aminosäure angegeben.

Eine "funktionale Mutation" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst einen Aminosäureaustausch in den genannten Sequenzbereichen, welcher zu einem "veränderten Reaktivitätsmuster" gemäß obiger Definition führt.

Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß P450 BM-3-Monooxygenase-Mutanten, welche wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäuresequenzbereichen 86-88 und gegebenenfalls 172-224 (gemäß SEQ ID NO.: 2) enthalten.

Eine erste Gruppe (A) geeigneter Mutanten weisen wenigstens eines der folgenden Aminosäuresubstitutionsmuster auf:

- a) F87V;
- b) F87A, L188K;
- c) F87V, L188K;
- d) F87A, L188K, A74G;
- e) F87V, L188K, A74G;
- f) F87A, L188K, A74G, R47F;
- g) F87V, L188K, A74G, R47F;
- h) F87A, L188K, A74G, R47F, V26T; oder
- i) F87V, L188K, A74G, R47F, V26T;

sowie funktionale Äquivalente davon.

Eine weitere Gruppe (B) geeigneter Mutanten weist eine einzelne der folgenden Aminosäuresubstitutionen auf:

- a) V26T,
- b) R47F,
- c) S72G,

- d) A74G,
- e) F87V,
- f) L188z, worin z für K, R, W, Q, N, G, A oder S steht, und
- g) M354T;

sowie funktionale Äquivalente davon.

In obigen Aufstellungen sind die Aminosäuren im Einbuchstabencode angegeben. Die durch Mutation erzeugte neue Aminosäure steht rechts neben der Positionsangabe für die Mutation.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäuresubstitution aufweisen, aber trotzdem zu einer Mutante führen, die ebenso wie die konkret genannte Mutante ein gegenüber dem Wildtyp "verändertes Reaktivitätsmuster" gemäß obiger Definition zeigen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Veränderungen im Reaktivitätsmuster qualitativ übereinstimmen.

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenase-Mutanten, welche in gleicher Weise wie die konkret genannten P450 BM3-Mutanten durch Mutation von P450-Enzymen aus anderen Organismen zugänglich sind. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen. Mit den modernen Methoden des Molecular Modeling können dann in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente, das Reaktionsmuster beeinflussende Mutationen vorgenommen werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen ebenso die durch eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten zusätzlichen Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit "verändertem Reaktivitätsmuster" im obigen Sinne führen.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine mutierte Monooxygenase oder ein "funktionales Äquivalent" gemäß obiger Definition. Diese Sequenzen sind vorzugsweise von SEQ ID NO: 1 durch Austausch von Codons entsprechend der obigen Aminosäuresubstitutionsmuster erhältlich.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten davon.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt er-

möglichst. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasme, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformierbar sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z. B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem biochemische Verfahren zur enzymatischen Herstellung von terminal oder subterminal (ω -1 bis ω -4) hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass man

a1) einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in Gegenwart eines Kulturmediums, das wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat enthält, kultiviert; oder

a2) ein Reaktionsmedium, enthaltend wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat, mit einer erfindungsgemäßen Mutante inkubiert; und

b) das gebildete hydroxylierte Produkt oder Produktgemisch aus dem Medium isoliert.

Im erfindungsgemäßen Verfahren sind die Carbonsäuren per se, oder Derivate davon, wie insbesondere C_1 - C_4 -Alkylester oder Carbinsäureamide, einsetzbar.

Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren als hydroxylierbare Carbonsäure C_8 - C_{30} -Monocarbonsäuren oder Derivate davon eingesetzt.

Besonders bevorzugt verwendet man im erfindungsgemäßen Verfahren als hydroxylierbare Carbonsäure eine C_8 - C_{12} -Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante gemäß obiger Gruppe (A).

Gemäß einem anderen erfindungsgemäßen Verfahren verwendet man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C_{12} - C_{30} -Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante ausgewählt unter den Einfachmutanten F87A, F87V, V26T, S72G, A74G und M354T, und den Mehrfachmutanten f) bis i) gemäß obiger Gruppe (A) einsetzt.

Wird das Verfahren mit angereichertem oder gereinigtem Enzym durchgeführt, so werden beispielsweise folgende Reaktionsbedingungen eingestellt:

Substratkonzentration: 0,1 bis 20 mg/ml

Enzymkonzentration: 0,1 bis 10 mg/ml

Reaktionstemperatur: 20 bis 40°C

pH: 6 bis 8

Puffer: 0,05 bis 0,2 M Kaliumphosphat, oder Tris/HCl

Elektronendonator: wird bevorzugt portionsweise zugegeben (Anfangskonzentration etwa 0,1 bis 2 mg/ml).

Vor dem Start der Reaktion durch Zugabe der Elektronendonors kann zur Aktivitätssteigerung Aceton in einer Konzentration von 1 bis 5% (v/v) zugegeben und kurzzeitig (1 bis 5 Minuten) vorinkubiert werden (bei etwa 20 bis 40°C).

Der Fachmann kann, abweichend davon, durch routinemäßige Versuche die jeweiligen Reaktionsbedingungen optimieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird gewöhnlich in Gegenwart von Luftsauerstoff sowie in Gegenwart eines Elektronendonors (oder Reduktionsäquivalents), wie insbesondere NADH, NADPH und Zn/Co(III)sephulchrat, durchgeführt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Zur Erzeugung von Varianten mit modifizierten enzymatischen Eigenschaften stehen im Rahmen des Protein-Engineerings zwei unterschiedliche Strategien zur Verfügung: zum einen die Methode des "rationalen Designs" (4) sowie die Methode der "gezielten Evolution" (5-7). Für ein erfolgreiches rationales Design ist ein hochaufgelöstes dreidimensionales Strukturmodell sowie eine vertiefte Kenntnis des Enzymmechanismus von zentraler Bedeutung. Während für das rationale Design die Fähigkeit gezeigt wurde, Enzymmutanten zu erzeugen, welche hohe Aktivität gegenüber nichtnatürlichen Substraten besitzen (4) ist der Effekt punktförmiger einzelner Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität, Aktivität und Spezifität der Mutanten häufig nicht vorhersagbar.

Obwohl Röntgenstrukturen von P450 BM-3 in der Protein-Data Bank (8) hinterlegt wurden, ist die Konformation von Substrat und P450 während des kritischen Hydroxylierungsschrittes weiterhin unklar (9-11). Für die Methode der gezielten Evolution ist eine effiziente Nachweismethode für ein schnelles Screening großer Bibliotheken von Zufallsmutanten

von zentraler Bedeutung. Ein optischer Test für die P450 BM-3-Mutante F87A, welche ω -para-Nitrophenoxycarbonsäuren (pNCA) verwendet, hat sich als brauchbar erwiesen (12, 13). Die Einzelmutante F87A verschiebt die Hydroxylierungsposition von Fettsäuren von der Position ω -1, ω -2 und ω -3 in Richtung der ω -Position (13) und führt außerdem zu einer vollständigen Umwandlung von 12-pNCA im Vergleich zu einer 33%igen Umwandlung, welche man für das Wildtyp-Enzym beobachtet (12). Da jedoch die Monooxygenase-Domäne von P450 BM-3 mehr als 400 Aminosäuren umfasst, kommt das Screening einer Bibliothek von Zufallsmutanten der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen gleich.

Zur Verbesserung der Effizienz der Suchprozedur wurde erfindungsgemäß das Verfahren des rationalen Designs mit dem Verfahren der gezielten Evolution kombiniert, um Mutanten mit modifizierter Reaktivität, insbesondere zur Erzeugung von Mutanten mit Spezifität für Fettsäuren mittlerer Kettenlänge, zu erzeugen. Die erfindungsgemäße Methode der "rationalen Evolution" basiert auf einem Computerunterstützten Protein-Modeling, um eine virtuelle Zufalls-Bibliothek zu erzeugen und um Reste zu identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die gewünschten Eigenschaften beeinflussen. Eine Unter-Bibliothek wird durch Randomisierung dieser Reste erzeugt und auf positive Mutanten gescreent. Ausgehend von einem Strukturmodell beginnt man mit der Bestimmung von Resten, welche möglicherweise für die Kettenlängenspezifität von Bedeutung sind. Zur Erzeugung von Mutanten mit verbesserten Eigenschaften wird die durch das Modell vorgeschlagene Mutationsstelle mit Hilfe der Sättigungsmutagenese modifiziert. Anschließend werden dann die Einzelmutanten mit den besten Eigenschaften unter Berücksichtigung des rationalen Designs miteinander kombiniert. Unter Anwendung dieser kombinierten Strategie konnte insbesondere, die Aktivität von P450 BM-3 für Substrate mittlerer Kettenlänge verbessert werden.

Unter Anwendung dieser Strategie und aufgrund der Sequenzhomologie zu P450-Enzymen anderen Ursprungs wird es dem Fachmann ermöglicht in analoger Weise weitere Mutanten herzustellen, welche ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Die vorliegende Erfindung wird nun durch folgende Beispiele und unter Bezugnahme auf beiliegende Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

Fig. 1 die schrittweise Optimierung von P450 BM-3 für das neue Substrat 8-pNCA. Die katalytische Effizienz gegenüber 8-pNCA ist für jede Mutante (in der Einheit $s^{-1}M^{-1}$) angegeben; und

Fig. 2 ein Modell des Komplexes der P450 BM-3-Mutante LARVF mit dem Substrat 8-pNCA. Die Seitenketten, welche die fünf besten Mutationspositionen aufweisen und die zur Mutante LARVF kombiniert wurden, sind dargestellt (V26T, R47F, A74G, F87V, L188K).

Methode 1

Modellierung des Substrat-P450 BM-3-Komplexes

Die Modellierung des Substrat-Enzym-Komplexes basierte auf der kristallographisch bestimmten Struktur von P450 BM-3, komplexiert mit Palmitoleinsäure (9). Diese Struktur ist bei der Protein-Data Bank hinterlegt (8). Die beschriebene Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,9 Å enthält vier Moleküle in einer asymmetrischen Einheitszelle. Kette A wurde als Referenz für den modellierten Komplex ausgewählt. Als Substratmolekül wurde ein Modell von 8-pNCA unter Verwendung des "Molecule Builder" von SYBYL (Tripos, Inc., St. Louis, USA) erzeugt. Die F87A-Mutation wurde unter Verwendung des Biopolymer-Tools von SYBYL erzeugt. Die C-Atome 1 bis 4 des Substrats wurden in die Bindungsstelle entsprechend den C-Atomen 6 bis 9 der gebundenen Palmitoleinsäure platziert. Die Torsionswinkel der Fettsäurekette wurden entsprechend der Trans-Konfiguration gewählt. NMR-Untersuchungen für P450 BM-3-Laurat- und -12-Bromlaurat-Komplexe zeigten, dass die Protonen der hydroxylierten C-Atome (C10 und C11) etwa 3,0 Å vom Häm-Eisen in der Oxidationsstufe II entfernt sind (10, 13). Auf der Basis dieses Ergebnisses wurden die entsprechenden Atome C7 und C8 von 8-pNCA in einem Abstand von 4 Å bzw. 3,6 Å vom Häm-Eisen platziert. Die para-Nitrophenoxygruppe wurde manuell in der Bindungstasche angeordnet. Außerdem wurde die Energie des Komplexes über fixierte Backbone-Atome minimiert.

Methode 2

Sättigungsmutagenese

Die erfindungsgemäß verwendeten Mutanten wurden mit Hilfe der Sättigungsmutagenese unter Verwendung des Stratagene QuikChange Kit (La Jolla, Kalifornien, USA) hergestellt. Neun Positionen in der Umgebung des Substrat-Bindungskanal, und zwar P25, V26, R47, Y51, 572, A74, F87, L188 und M354, wurden für die Mutation über das P450 BM-3-Modeling ausgewählt. Die Primer für jede dieser Positionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

ausgewählte Positionen	Primer	Sequenz Nr.
P25	5'-gttattaacacagataaannngttcaagctttgatg-3' 5'-catcaaagcttgaacnnntttatctgtgtttaataac-3'	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10
V26	5'-gttattaacacagataaaccgnnncaagctttgatg-3' 5'-catcaaagcttgnnncggtttatctgtgtttaataac-3'	SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 12
R47	5'-cgaggcgcttgtnnnngtaacgcgctacttctc-3' 5'-gataagtagcgcttacnnnaccaggcgctctcg-3'	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14
Y51	5'-cctggctgtgtaacgcgcnnnttatcaagtcagc-3' 5'-gctgacttgataannngcgcttacacgaccagg-3'	SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 16
S72	5'-gctttgataaaaacttannncaagcgcttaaatgtacg-3' 5'-cgtacaaaatttaagcgcttgnnntaagtttttatcaaagc-3'	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 18
A74	5'-gctttgataaaaacttaaaagtcaannncttaaatgtacg-3' 5'-cgtacaaaatttaagnnnttgacttaagtttttatcaaagc-3'	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8
L188	5'-gaagcaatgaacaagnnnacgagcgaatccag-3' 5'-ctggatttgctcgctgnnnctgttcattgcttc-3'	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6
M354	5'-ggcgacgaactannngttctgattcctcag-3' 5'-ctgaggaatcagaacnnntagttcgctgcc-3'	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 20
F87	5'-gcaggagacggggttgnnnacaagctggacg-3' 5'-cgtccagcttgtnnncaaccccgctctcctgc-3'	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4

Die Reaktionsbedingungen waren für alle mutagenen PCR-Verfahren identisch, mit Ausnahme der Annealing-Temperatur, welche in folgender Weise variiert wurde: 50°C für die Positionen 25, 26, 188 und 354; 52°C für die Positionen 47 und 51; und 46°C für die Positionen 72, 74 und 87. Die Reaktionen wurden in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, wobei jeder Ansatz 17,5 µmol jedes Primers, 20 µmol der Template-Plasmid-DNA, 3 U der Pfu-Polymerase und 3,25 nmol jedes dNTP enthielt. Die Reaktion wurde bei 95°C, 4 Minuten, gestartet, anschließend wurde 20-mal folgender Thermocyclus durchlaufen: 95°C, 1 Min.; 46. = 52°C, 2,5 Min.; 72°C, 17 Min.; nach diesen 20 Cyclen wurde die Reaktion 15 Minuten bei 72°C fortgesetzt. Für die ortsspezifische Mutagenese durch PCR wurde ein Einzelcodon für den Austausch einer Aminosäure verändert. Für die Randomisierung einer spezifischen Aminosäure wurden Primer verwendet, in denen "nnn" für die spezifische Aminosäure codiert. Alle PCR-Produktlösungen wurden mit 20 U DpnI bei 37°C über 3 Stunden behandelt, um die ursprüngliche, nicht-mutierte Template-DNA zu verdauen. Anschließend erfolgte die Transformation in E. coli DH5α.

Methode 3

Expression und Reinigung von Wildtyp-Enzym sowie der Mutanten

Das P450 BM-3-Wildtyp-Gen und dessen Mutanten wurden unter der Kontrolle des starken, Temperatur-induzierbaren P_{RPL} -Promotors pCYTEXP1 in E. coli Stamm DH5α (supE44, lacU169 [80lacZ M15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) exprimiert. Die einzelne Punktmutation F87A wurde, wie aus dem Stand der Technik bekannt (12), eingeführt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Nach 12- bis 24-stündigem Wachstum wurden die Kolonien mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen platziert, wobei jede Vertiefung 200 µl TB-Medium (12 g Tryptophan, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, H₂O (dest.) ad. 1 Liter) mit 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 40 µl aus jeder Vertiefung entnommen und in Kulturröhrchen überführt, welche 2 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthielt, und anschließend wurde 2 Stunden bei 37°C und dann 6 Stunden bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 Upm 5 Minuten abzentrifugiert, mit Lysozym aus Hühnereiweiß (1 U/ml) behandelt und dann zweimal gefroren und aufgetaut. Die Zell-Rohextrakte erhielt man durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 Upm. Der so erhaltene Überstand wurde für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Zur Herstellung gro-Ber Enzymmengen wurde ein 2 l-Schüttelkolben mit 300 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet, bei 37°C inkubiert und 2 Stunden bei 200 Upm geschüttelt (OD_{578nm} = 0,8 bis 1,0) und anschließend 6 Stunden bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm gesammelt und in 15 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4 suspendiert. Die eisgekühlte Suspension wurde mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Deutschland) (80 W, 2 Minuten, 3 Cyclen) aufgeschlossen. Die Suspension wurde 20 Minuten bei 32570 x g zentrifugiert. Die Rohextrakte

wurden zur Bestimmung der Enzymaktivität oder zur Enzymreinigung verwendet.

Die Enzymreinigung wurde wie in (14) beschrieben, durchgeführt, wobei jedoch eine BioPilot-Chromatographieanlage (Pharmacia, Schweden) verwendet wurde. Die Reinheit des Enzyms wurde durch Bestimmung des Gesamtproteins sowie der Menge des Enzyms festgestellt. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Differenz zwischen dem Extinktionsspektrums des Carbonylkomplexes der Eisen-(II)-form im Vergleich zur Eisen-(II)-form unter Verwendung einer molekularen Absorptivität von $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das Wellenlängenpaar 450 nm und 490 nm bestimmt (I).

Methode 4

Isolierung von Mutanten mit höherer Aktivität für Substrate kürzerer Kettenlänge

Die Mutante F87A von P450 BM-3 wurde anstelle des Wildtyps als Template-DNA verwendet. Die Mutationen für die jeweilige Position wurden wie oben beschrieben hergestellt. Jeweils etwa 100 Kolonien wurden zur Durchmusterung des Sequenzraumes an jeder Position gepickt, in Kulturröhrchen kultiviert und Zellen wurden daraus isoliert und lysiert. Die Zell-Rohextrakte einer jeden ausgewählten Kolonie wurden für den Aktivitätstest verwendet. Sämtliche Mutanten, die im Vergleich zu F87A eine höhere Aktivität für wenigstens ein Substrat mit einer kürzeren Kettenlänge als 15-pNCA zeigten, wurden zur Bestimmung der Mutationen sequenziert.

Die Mutante mit der jeweils höchsten Aktivität für 12-pNCA, 10-pNCA oder 8-pNCA von allen Mutanten für die gleiche Position wurde für eine spätere Kombination mit anderen Mutationen ausgewählt. Die kombinierte Mutation wurde schrittweise durch ortsspezifische Mutagenese ausgeführt. Der Kombinationsweg ist in Figur dargestellt. Sechs Kolonien wurden für jeden Kombinationsschritt für die Bestimmung der Substratspezifität isoliert. Eine Kolonie mit repräsentativer Substratspezifität wurde ausgewählt und die Substratspezifität wurde für das reine Enzym bestimmt. Das Plasmid der ausgewählten Kolonie wurde für den nächsten Schritt der ortsspezifischen Mutagenese verwendet. Die Mutationen in der Endmutante wurden durch DNA-Sequenzierung bestimmt (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und ABI Prism™ 377 DNA Sequencer).

Methode 5

Enzym-Aktivitätstest

Für den pNCA-Aktivitätstest wurden 8 µl einer 10 mM pNCA-Lösung in DMSO in einer Einwegküvette in einem Endvolumen von 1 ml durchgeführt. Nach Zugabe von 850 µl Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,1 bis 0,4 nmol P450 zu der jeweiligen pNCA-DMSO-Lösung wurden die Proben 5 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer wässrigen Lösung von 1 mM NADPH gestartet wurde. Zur Bestimmung von K_{cat} und K_m wurde eine Konzentrationsreihe für die verschiedenen pNCA-Substrate erstellt (bezüglich Details des Nachweisverfahrens kann auf (12) verwiesen werden).

Zur Durchführung des pNCA-Tests in einer Mikrotiterplatte wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtreaktionsvolumen von 250 µl in Tris/HCL-Puffer (0,1 M, pH 8,2) entweder 60 nmol 8-pNCA, 15 nmol 10-pNCA, 15 nmol 12-pNCA oder 15 nmol 15-pNCA, jeweils gelöst in 2,5 µl DMSO. Nach 5-minütiger Vorinkubation mit 40 µl P450 BM-3-Proben wurde die Reaktion durch Injektion von 30 µl einer 1 mM NADPH-Lösung in jede Vertiefung gestartet. Die Platten wurden unmittelbar nach Zugabe der NADPH-Lösung auf einem Platten-Lesegerät bei 405 nm vermessen.

Methode 6

Umsetzung von Carbonsäuren mit erfindungsgemäßen Mutanten und Bestimmung der Produkte

a) Chemische Reaktion

Für die Hydroxylierung der Fettsäuren in Anwesenheit von P450 BM-3 bzw. seiner Mutanten wurde folgender Ansatz gewählt:

P450 BM-3-Mutante: 20 mg

Reaktionspuffer: 20 ml (Tris/HCl 50 mM, KCl 250 mM, pH 7,8)

Fettsäure: 10 mg

Aceton: 400 µl (2% v/v) (beschleunigt Reaktion um Faktor 2).

Das Enzymlyophilisat wurde vor der Reaktion in 1 ml Reaktionspuffer gelöst und zunächst 30 min bei 36°C inkubiert. Die Inkubation führt wie die Zugabe von 2 Vol.-% Aceton zu einer Aktivitätssteigerung von 60 bzw. 75%.

Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 500 µl der vorbereiteten NADPH-Lösung (12,5 mg/ml). Der Verlauf der Reaktion wurde durch Absorptionsmessungen bei 340 nm verfolgt, wobei der Verbrauch von NADPH beobachtet werden kann. Für eine stöchiometrische Umsetzung wären theoretisch 4 ml NADPH-Lösung notwendig, eine zu hohe Konzentration an NADPH in der Reaktionslösung führt jedoch zur Inaktivierung des Enzyms, deshalb wird der Co-faktor in 500 µl-Schritten zugegeben.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 5 M Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 2 angesäuert. Dabei fallen die Fettsäuren bzw. hydroxylierten Fettsäuren aus und führen zu einer sichtbaren Trübung der Lösung. Danach wurde zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Filtration über einen Faltenfilter erfolgte die Entfernung des Dichlormethans am Rotationsverdampfer oder durch Eindampfen mit Stickstoff. Der verbliebene weiße Feststoff wurde dann wieder in 2 ml Dichlormethan aufgenommen und für die GC-Analyse verwendet.

b) Gaschromatographische Analyse

Für die Analyse wurde ein Fisons Gaschromatograph (Fisons Instruments Mega Series, Mainz, Deutschland) mit FID verwendet (Optima 5-Säule, 25 m x 0,25 mm ID, Macherey & Nagel, Düren, Deutschland).

5 Zur Analyse wurden Edukte und Produkte mit MSHFBA silyliert. Dabei werden alle Hydroxyl- und Säuregruppen in die entsprechenden Trimethylsilylether bzw. -ester umgewandelt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probe wasserfrei ist, da es sonst zu Nebenreaktionen mit dem Silylierungsgagens kommt. Zu 10 µl der hydroxyfettsäurehaltigen Dichlormethan-Lösung wurden 15 µl MSHFBA pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Dichlormethan erfolgte die GC-Analyse.

10 Dazu wurde 1 µl der silylierten Proben in den Gaschromatographen eingespritzt. Injektor- und Detektortemperatur lagen bei 350°C. Folgende Temperaturprogramme wurden verwendet:

Caprylsäure

15 100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 200 °C $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Caprinsäure

20 100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 140 °C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Laurinsäure

25 100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 170 °C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Beispiel 1

Selektion der Anfangsmutante

30 Die Einzelmutante F87A von P450 BM-3 wurde als Ausgangs-Template verwendet. Wie bereits erwähnt, wird durch diese Mutation die Hydroxylierungsposition in gesättigten C12- und C14-Fettsäuren von ω -1, ω -2 und ω -3 in Richtung der ω -Position verschoben (13). Für die Umsetzung von 12-pNCA und 15-pNCA wurde ebenfalls gezeigt, dass die ω -Hydroxylierung im Vergleich zum Wildtyp signifikant verstärkt wird (12). Für die ω -Hydroxylierung von 12-pNCA erhielt man eine vollständige Umwandlung, verglichen mit einer 33%igen Umwandlung für den Wildtyp. Zusätzlich zur
35 erhöhten Regioselektivität beobachtete man auch erhöhte Aktivitäten für 12-pNCA und 15-pNCA (vergleiche Tabelle 2).

Tabelle 2

Spezifische Aktivität ausgewählter P450 BM-3-Mutanten für verschiedene pNCA-Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge¹

Substrat	WT	F87A	L188K	V26T	R47F	S72G	A74G	M354T
15-pNCA	405	410	288	519	258	439	474	560
12-pNCA	141	284	316	555	233	596	517	480
10-pNCA	339	92	207	106	52	150	103	171
8-pNCA	15	2	69	16	13	3	6	4

¹ Einheiten spezifischer Aktivität: nmol/min/nmol P450

Die erhöhte Regioselektivität von F87A ist anhand des Strukturmodells verständlich. Die Substitution des sperrigen Restes F87 durch Alanin vergrößert die Bindungstasche für die p-Nitrophenoxygruppe, welche durch F87, außerdem durch V78, A82, T260, I263 und A264 gebildet wird. Außerdem wird der Zugang der großen p-Nitrophenoxygruppe zur Bindungstasche erleichtert und die sterischen Wechselwirkungen zwischen F87 und den C-Atomen ω -2 und ω -1 der pNCA werden eliminiert. Dies ermöglicht eine vorteilhaftere Orientierung der ω -Position gegenüber dem Häm-Eisenatom.

Beispiel 2

Selektion einzelner Mutationspositionen durch Modeling, ortsspezifische Randomisierungsmutagenese ausgewählter Positionen und Screening

1. Selektion der Mutationspositionen

Das Modell des gebundenen C8-pNCA-Substrats zeigt, dass sich das Carboxylat in einem Abstand von 9 und 11 Å zu den Carboxylat-bindenden Resten R47 bzw. Y51 befindet. Um Aktivität gegenüber C8-Substraten zu induzieren, ist es

erforderlich, eine neue Bindungsstelle zu erzeugen, welche sich in geeigneter Distanz zur Carboxylatgruppe des Substrats befindet. Zur Erleichterung der Bindung von 8-pNCA sollten zusätzliche Reste innerhalb der Bindungsstelle positioniert werden. Folgende Reste wurden ausgewählt: Die Reste R47 und Y51, welche die ursprüngliche Carboxylat-Bindungsstelle bilden. Für R47 wird die Bildung eines Ionenpaares zwischen dessen Guanidiniumgruppe und dem Carboxylatrest des Substrats vorgeschlagen; Y51 bildet eine H-Brücke mit der Carboxylatgruppe des Substrats (9). Für den Palmitoleinsäure/P450 BM-3-Komplex beträgt die Distanz zwischen dem C α -Atom von R47 und dem C-Atom der Fettsäurecarboxylatgruppe 12 Å. Sämtliche Reste in der Hemisphäre mit einem 12 Å-Radius um die Carboxylatgruppe des 8-pNCA-Modells wurden bestimmt und nur solche innerhalb der Bindungstasche mit Seitenketten, die in Richtung der Carboxylatgruppe der Fettsäure weisen, wurden ausgewählt. So wurden P25, V26, S72, A74, L188 und M354 ausgewählt, welche wahrscheinlich eine neue Carboxylat-Bindungsstelle für kurzkettige pNCA-Verbindungen ausbilden könnten. Diese sechs ausgewählten Reste befinden sich auf sekundären Strukturelementen mit flexibler Konformation (11).

2. Mutation und Screening

Mutanten von jedem der acht ausgewählten Reste wurden durch ortsspezifische Randomisierung des Wildtyp-Codons an den entsprechenden Positionen erzeugt. Um sicherzustellen, dass die meisten der 19 möglichen Arten von Aminosäuren getestet werden, wurden 100 Kolonien einer jeden Position isoliert, kultiviert und auf Aktivität getestet. (Damit beträgt die Wahrscheinlichkeit, jede Aminosäure zu testen, mehr als 95%, ausgenommen einer Wahrscheinlichkeit von 79% für Tryptophan und Methionin). Die Mutanten mit einem höheren Aktivitätswert für wenigstens ein Substrat mit kürzerer Kettenlänge als 15-pNCA wurden für die Sequenzierung zur Bestimmung der Mutation (Mutationen) ausgewählt.

Es zeigte sich, dass Position 188 relativ variabel ist. Die meisten der 100 Kolonien zeigten Aktivität für pNCA. Daraus wurden entsprechend ihrer Aktivität gegenüber 8-pNCA 37 Kolonien ausgewählt. 16 verschiedene Aminosäuretypen, einschließlich dem Wildtyp wurden detektiert. Dieses Ergebnis bestätigte außerdem, dass die Auswahl von 100 Kolonien ausreichend war, um sicherzustellen, dass die meisten der 20 möglichen Aminosäuren getestet werden können. Von den 15 Substitutionen erhöhten die Substitutionen K, R, W, Q, N, G, A und S signifikant die katalytische Aktivität für Substrate mit kürzerer Kettenlänge. Die Substitution von L durch negativ geladene Aminosäuren führte zu einer Verringerung der Aktivität gegenüber 10-pNCA, 12-pNCA und 15-pNCA um das Drei- bis Siebenfache.

Die anderen sieben Positionen wurden in ähnlicher Weise wie Position 188 randomisiert. Von jeder Position wurden 7 bis 19 Kolonien für die DNA-Sequenzierung zum Nachweis der Mutation (Mutationen) ausgewählt. Die meisten dieser Gene waren entweder nicht mutiert oder das Genprodukt zeigte eine verringerte Aktivität für Substrate kürzerer Kettenlänge (Tests wurden mit reinem Enzym durchgeführt). Jeweils nur eine Mutante der Positionen 26, 47, 74 und 354, zwei Mutanten der Position 72 und keine Mutante der Positionen P25 und Y51 zeigte im Vergleich zu 15-pNCA für Substrate kürzerer Kettenlänge eine höhere Aktivität. Die Mutante mit der höchsten Aktivität für 8-pNCA in Position 188 und Position 72 sowie sämtliche Einzelmутanten der Positionen 26, 47, 74 und 354 wurden für eine Kombination ausgewählt. Diese Mutationen, welche in obiger Tabelle 2 aufgelistet sind, enthalten folgende Substitutionen: V26T, R47F, S72G, A74G, L188K und M354T. Im Vergleich zu F87A erhöhte sich die spezifische Aktivität gegenüber 8-pNCA um den Faktor 0,5 bis 33,5. Jede dieser Mutationen wurde mit der Ursprungsmutation F87A schrittweise kombiniert.

Beispiel 3

Mehrfachmutanten, hergestellt durch schrittweise Kombination von Mutanten und deren Screening

1. Mutante L (F87A, L188K)

Die Auswahl der ersten Mutante ist kritisch, da die Kombination von Einzelmутanten nicht notwendigerweise in einer Kumulation der Einzeleffekte resultiert. Eine falsche Auswahl der ersten Mutation könnte in die Richtung eines Evolutionsweges lenken, der nicht zu einer optimalen Mehrfachmutation führt. Im Falle eines großen Ausgangspools von Einzelmутanten ist daher eine enorme kombinatorische Vielfalt wahrscheinlich, und das Auffinden der gewünschten Mehrfachmutante ist folglich unwahrscheinlich.

Zwei Kriterien sprechen für die Auswahl der Mutante L als Ausgangspunkt: deren erhöhte Aktivität gegenüber 8-pNCA im Vergleich zu allen anderen Mutanten (Tabelle 2) sowie die Veränderungen in der Enzym-Substratwechselwirkung und den Eigenschaften der Bindungsstelle. Zur Verifizierung dieser Veränderungen wurden Strukturmodelle der ausgewählten Mutanten dadurch erzeugt, dass man die Seitenketten der Mutationspositionen mit Hilfe der SYBYL-Methode ersetzte. L188 ist am C-Terminus der α -Helix F lokalisiert. Diese Helix und die benachbarten G Helices erfahren die größte Verschiebung durch eine Substratbindung (9). Das Modell veranschaulicht, dass ein Austausch von Leucin durch Lysin zur Bildung einer neuen putativen Carboxylat-Bindungsstelle führt. Der Abstand zwischen der Amino- gruppe von K188 und dem Carboxylatrest von 8-pNCA beträgt 6 Å und ist somit vergleichbar mit dem experimentell bestimmten Abstandswert für die Carboxylatgruppe der Palmitoleinsäure und der Guanidiniumgruppe von R47 (dem ursprünglichen Bindungsrest). Die Distanz zwischen der Guanidiniumgruppe von R47 und der Carboxylatgruppe von 8-pNCA beträgt 11,4 Å. Es kann daher vorgeschlagen werden, dass die Ionenpaar-Wechselwirkungen zwischen der Carboxylatgruppe des Substrats und K188 zusammen mit dem hydroxylierten C8-Atom in reaktiver Distanz zum Häm-Eisenatom erfolgen.

Die anderen fünf Mutanten wurden schrittweise mit der Mutante L durch ortsspezifische Mutagenese kombiniert (vergleiche Fig. 1). Für jeden Mutagenese-Schritt wurde ein Strukturmodell der selektierten Mutanten erzeugt. Anhand dieses Modells wurden die Einflüsse der erzeugten Mutanten auf die Substratbindung untersucht und eine rationale Erklärung für die optimierten Eigenschaften der Mutanten und ihrer Kombinationen wurde davon ausgehend vorgeschlagen.

2. Mutante LA (F87A, L188K, A74G)

Die katalytische Effektivität gegenüber 8-pNCA erhöhte sich durch Einführung der Mutation A74G in die Mutante L. A74 befindet sich am N-Terminus der α -Helix B'. Da die Seitenkette von A74 sterisch mit der Aminogruppe von K188 interagiert, wird durch einen Austausch von A74 durch Glycin diese Wechselwirkung eliminiert, wodurch eine vorteilhaftere Orientierung der Seitenkette gegenüber der Carboxylatgruppe des Substrats ermöglicht wird.

3. Mutante LAR (F87A, L188K, A74G, R47F)

Die Verbesserung der katalytischen Effizienz für 8-pNCA gelang durch Einführung der zusätzlichen Mutation R47F. Die Mutation R47F hat zwei mögliche Effekte. Phenylalanin behindert die ursprüngliche Carboxylatbindung und vergrößert den dem Lösungsmittel ausgesetzten hydrophoben Abschnitt am Eingang des Bindungskanals, der von den Resten F11, L14, L17, P18, P45 und A191 gebildet wird (vergleiche Fig. 2). Dieser hydrophobe Abschnitt ist von besonderer Bedeutung für die Substratanbindung (11).

4. Mutante LARV (F87A, L188K, A74G, R47F, V26T)

Wird die Mutation M354T der Mutante LAR hinzugefügt, so verringert sich K_{cat} für 8-pNCA. M354T wurde deshalb aus weiteren Kombinations-Versuchen ausgeklammert. Fügt man jedoch die Mutation V26T der Mutante LAR zu, so zeigt die resultierende Mutante LARV einen geringfügig höheren K_{cat} -Wert und einen geringfügig geringeren K_m -Wert als LAR. Die katalytische Effizienz gegenüber 8-pNCA erhöhte sich. Wird statt dessen die Mutation S72 G in der Mutante LAR durchgeführt, so verringerte sich K_{cat} für 8-pNCA. Aus diesem Grund wurde die Mutante LARV für weitere Mutationen ausgewählt.

V26 ist am N-Terminus der α -Helix A lokalisiert. Das Modell weist darauf hin, dass T26 die Rolle des ursprünglichen Restes Y51 der Bindungsstelle übernehmen könnte und die Carboxylatgruppe des Substrates durch Ausbildung einer H-Brücke stabilisieren könnte. Der Abstand zwischen der Hydroxylgruppe von T26 und der Aminogruppe von K188 beträgt 6,9 Å. Verglichen mit der ursprünglichen Bindungsstelle ist dieser Abstand um etwa 2 Å größer (4,8 Å zwischen der Hydroxygruppe von Y51 und der Guanidiniumgruppe von R47). Es besteht somit die Möglichkeit, dass die K188-haltige F-Helix weiteren Konformations-Änderungen unterzogen wird, aufgrund derer 8-pNCA tiefer in der Bindungsregion festgehalten wird und die Distanz zwischen T26 und K188 verringert wird.

5. Mutante LARVF (F87V, L188K, A74G, R47F, V26T)

Es konnte gezeigt werden, dass Position 87 von besonderer Bedeutung für die katalytische Aktivität und die Substratspezifität des Enzyms ist (3, 13). Die Mutante LARV wurde deshalb in Position 87 durch ortsspezifische randomisierte Mutagenese optimiert. Von 100 Kolonien wurde eine Mutante erhalten, welche eine katalytische Effizienz von $3,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ gegenüber 8-pNCA zeigte. Die DNA-Sequenzdaten ergaben, dass Alanin in Position 87 durch Valin ersetzt war.

Aus der Kristallstruktur (11) und früheren Experimenten (3, 13) ist bekannt, dass R87 wichtig für den Zugang des Substrates zum Häm-Eisen ist. Die sperrige para-Nitrophenylgruppe dieses Substrats machte es notwendig, die Größe der Bindungsstelle durch den Austausch von Phenylalanin durch Alanin zu erhöhen. Durch den Austausch von A87 durch Valin wird der Kontakt von C_{α} mit dem Häm-Eisenatom aufgrund sterischer Wechselwirkungen zwischen dem Ethersauerstoff und der Seitenkette von V87 verbessert.

Die Daten zeigen, dass zwei Schlüsselschritte, F87A zu L und LARV zu LARVF, die katalytische Effizienz gegenüber 8-pNCA erhöhten. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die anderen Mutationen in der Mutante LARVF wieder rückgängig gemacht werden können, ohne die Aktivität für 8-pNCA zu verlieren. Deshalb wurden Mutanten hergestellt, die statt der Mutation F87A die Mutation F87V enthalten. Diese Mutanten tragen folgende Bezeichnungen:

- 1) L7V mit den Mutationen F87V L188K
- 2) AL7V mit den Mutationen F87V L188K A74G
- 3) ARL7V mit den Mutationen F87V L188K A74G R47F

Bei den Aktivitätstests wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 3

Kinetische Parameter von P450 BM-3-Mutanten für pNCA-Derivate unterschiedlicher Kettenlänge, ermittelt bei pH 8,0 und 25°C

	Kcat (s ⁻¹)			Km (μM)			Kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)		
	12	10	8	12	10	8	12	10	8
F87V	0,7	1,8	-	3,8	8,5	-	1,7·10 ⁵	2,1·10 ⁵	-
L7V	2,8	4,7	-	6,4	14,2	-	4,3·10 ⁵	3,3·10 ⁵	-
AL7V	2,2	5,9	4,3	15,1	22,7	197,6	1,4·10 ⁵	2,6·10 ⁵	2,0·10 ⁴
ARL7V	1,4	5,5	3,9	8,9	17,5	41,4	1,7·10 ⁵	3,1·10 ⁵	9,3·10 ⁴
ARVLF	1,4	7,2	0,2	12,3	44,8	6,5	9,2·10 ⁴	1,6·10 ⁵	3,5·10 ⁴

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutanten F87V und L7V für das Substrat 8-pNCA keinen messbaren Umsatz zeigen. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Vierfachmutante ARL7V eine noch bessere katalytische Effizienz aufweist als die Fünffachmutante ARVLF.

Die Mutanten ARL7V und ARVLF zeigen weiterhin hohe Aktivitäten für Caprinsäure (C10), die um zwei Kohlenstoffatome kürzer ist als das native kürzeste Fettsäure-Substrat des Wildtyp-Enzyms.

Außerdem wurden ω-4-monohydroxylierte Produkte beobachtet, wenn Laurinsäure (C12) als Substrat verwendet wird, wohingegen das Wildtyp-Enzym von P450 BM-3 nur in den Positionen ω-1, ω-2 und ω-3 aktiv ist.

Beispiel 4

Bestimmung der bevorzugten Hydroxylierungsposition für Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und verschiedene Mutanten und Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym

Die Reaktionsansätze werden gemäß oben beschriebener Methode 6 aufgearbeitet und analysiert.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4

Hydroxylierungs- positionen	Caprinsäure (C10) [%]	Laurinsäure (C12) [%]
Wildtyp		
ω -3	-	34
ω -2	-	28
ω -1	-	38
Mutante L7V		
ω -3	-	53
ω -2	-	30
ω -1	-	17
Mutante F87V		
ω -3	-	51
ω -2	-	25
ω -1	-	24
Mutante AL7V		
ω -3	-	28
ω -2	-	54
ω -1	-	18
Mutante ARL7V		
ω -3	14	35
ω -2	33	50
ω -1	53	15
Mutante ARVLF		
ω -3	15	34
ω -2	30	53
ω -1	55	13

Auffallend bei der Hydroxylierung von Laurinsäure ist zunächst ein Wechsel der Regioselektivität beim Übergang vom Wildtyp zu P450 BM-3 F87V, das eine ω -3-Hydroxylierung bevorzugt katalysiert, ebenso wie P450 BM-3 L7V. Beim Übergang zur Dreifachmutante ändert sich die Regioselektivität erneut, P450 BM-3 AL7V, P450 BM-3 ARL7V und P450 BM-3 ARVLF dirigieren die Hydroxylierung bevorzugt in die ω -2-Position.

Alle GC-Analysen zeigen, dass Caprinsäure nur von P450 BM-3 ARVLF und P450 BM-3 ARL7V umgesetzt wird, bei den anderen Mutanten wurde ein Umsatz unter 1% festgestellt. Beide Enzyme weisen fast identische Regioselektivität, mit der Bevorzugung ω -1-Position auf.

Zur Bestimmung der Reaktionsausbeuten wurden Gaschromatogramme von Standards aufgenommen. Als Eduktstandard fand eine Caprinsäure- bzw. Laurinsäurelösung mit Dichlormethan als Lösungsmittel (Konzentration 0,5 mg/ml) Verwendung. Aufgrund der FID-Detektmethode können die Peakflächen von Edukt und Produkten nicht einfach zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, da Moleküle unterschiedlicher Struktur- und Summenformel bei der Verbrennung unterschiedliche Ionenströme erzeugen. Diese Ionenströme sind nicht proportional zum Stoffmengenverhältnis von Edukt und Produkten. Als Produktstandard wurde deshalb käuflich erwerbbare 10-Hydroxycaprinsäure bzw. 12-Hydroxylaurinsäure verwendet. Die Summenformeln der Standards und der Produkte sind gleich, und die Struktur unterscheidet sich nur in der Stellung der Hydroxylgruppe, weshalb bei gleichen Stoffmengen annähernd von gleichen detektierbaren Ionenströmen ausgegangen wird.

Bei den Hydroxylierungen von Caprinsäure mit P450 BM-3 ARVLF und P450 BM-3 ARL7V-Katalyse betrugen die kumulierten Ausbeuten an Produkt 57% bzw. 38%. Bei den Hydroxylierungen von Laurinsäure betrug die Ausbeute bei P450 BM-3 ARVLF-Katalyse 51%, bei allen anderen Mutanten und dem Wildtyp zwischen 38% und 40%.

Literatur

1. Boddupalli, S. S., et al., (1990) J. Biol. Chem. 265, 4233-4239;
2. Capdevila, J. H., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 22663-22671;
3. Graham-Lorence, S., et al., (1997) J. Biol. Chem. 272, 1127-1135;
4. Cleland, J. L. und Craik, C. S., Eds. (1996) Protein Engineering: Principles and Practice, Wiley-Liss, New York;
5. Ruchner, O. und Arnold, F. H., (1997) Trends Biotechnol. 15, 523-530;
6. Stemmer, W. P. C. (1994) Nature (London) 370, 389-391;
7. Bornscheuer, U. T., (1998) Angew. Chem 110, 3285-3288;
8. Bernstein, F. C., et al., (1977) J. Mol. Biol. 112, 525-542;
9. Li, H. und Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol. 4, 140-146;
10. Modi, S., et al., (1996) Nat. Structural Biol. 3, 414-417;
11. Ravichandran, K. G., et al., (1993) Science 261, 731-736;
12. Schwaneberg, U., et al., (1999) Anal. Biochem. 269, 359-366;
13. Oliver, C. F., et al., (1997) Biochemistry, 36, 1567-1572;
14. Schwaneberg, U., et al., J. Chromatography A, in press;
15. Cherry, J. R., et al., (1999) Nature Biotechnology, 17, 379-384.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 100 11 723 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/40434

10 <140>
<141>

<160> 20

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 3150

20 <212> DNA
<213> Bacillus megaterium

<220>
<221> CDS

25 <222> (4) .. (3150)

<400> 1

atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa	48
Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys	
1 5 10 15	
aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa	96
Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys	
20 25 30	
att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt	144
Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg	
35 40 45	
gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat	192
Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp	
50 55 60	
gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt	240
Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg	
65 70 75	
gat ttt gca gga gac ggg tta ttt aca agc tgg acg cat gaa aaa aat	288
Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn	
80 85 90 95	
tgg aaa aaa gcg cat aat atc tta ctt cca agc ttc agt cag cag gca	336
Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala	
100 105 110	
atg aaa ggc tat cat gcg atg atg gtc gat atc gcc gtg cag ctt gtt	384
Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val	
115 120 125	
caa aag tgg gag cgt cta aat gca gat gag cat att gaa gta ccg gaa	432
Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu	
130 135 140	
gac atg aca cgt tta acg ctt gat aca att ggt ctt tgc ggc ttt aac	480
Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn	

DE 100 11 723 A 1

145	150	155		
tat cgc ttt aac agc ttt tac cga gat cag cct cat cca ttt att aca			528	
Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr				5
160	165	170		
agt atg gtc cgt gca ctg gat gaa gca atg aac aag ctg cag cga gca			576	
Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala				10
180	185	190		
aat cca gac gac cca gct tat gat gaa aac aag cgc cag ttt caa gaa			624	
Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu				15
195	200	205		
gat atc aag gtg atg aac gac cta gta gat aaa att att gca gat cgc			672	
Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg				20
210	215	220		
aaa gca agc ggt gaa caa agc gat gat tta tta acg cat atg cta aac			720	
Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn				25
225	230	235		
gga aaa gat cca gaa acg ggt gag ccg ctt gat gac gag aac att cgc			768	
Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg				30
240	245	250		
tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt			816	
Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly				35
260	265	270		
ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta gtg aaa aat cca cat gta tta			864	
Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu				40
275	280	285		
caa aaa gca gca gaa gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca			912	
Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro				45
290	295	300		
agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac			960	
Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn				50
305	310	315		
gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca			1008	
Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala				55
320	325	330		
aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac			1056	
Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp				60
340	345	350		
gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg			1104	
Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp				65
355	360	365		
gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt			1152	
Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser				
370	375	380		
gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg			1200	
Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala				
385	390	395		
tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt			1248	

DE 100 11 723 A 1

	Cys	Ile	Gly	Gln	Gln	Phe	Ala	Leu	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	
	400					405				410						415	
5	atg	atg	cta	aaa	cac	ttt	gac	ttt	gaa	gat	cat	aca	aac	tac	gag	ctg	1296
	Met	Met	Leu	Lys	His	Phe	Asp	Phe	Glu	Asp	His	Thr	Asn	Tyr	Glu	Leu	
				420					425						430		
10	gat	att	aaa	gaa	act	tta	acg	tta	aaa	cct	gaa	ggc	ttt	gtg	gta	aaa	1344
	Asp	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Phe	Val	Val	Lys	
				435					440					445			
15	gca	aaa	tcg	aaa	aaa	att	ccg	ctt	ggc	ggt	att	cct	tca	cct	agc	act	1392
	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	
			450					455					460				
20	gaa	cag	tct	gct	aaa	aaa	gta	cgc	aaa	aag	gca	gaa	aac	gct	cat	aat	1440
	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Asn	Ala	His	Asn	
		465					470					475					
25	acg	ccg	ctg	ctt	gtg	cta	tac	ggt	tca	aat	atg	gga	aca	gct	gaa	gga	1488
	Thr	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	
	480				485					490						495	
30	acg	gcg	cgt	gat	tta	gca	gat	att	gca	atg	agc	aaa	gga	ttt	gca	ccg	1536
	Thr	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	
				500					505						510		
35	cag	gtc	gca	acg	ctt	gat	tca	cac	gcc	gga	aat	ctt	ccg	cgc	gaa	gga	1584
	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Ser	His	Ala	Gly	Asn	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	
				515					520					525			
40	gct	gta	tta	att	gta	acg	gcg	tct	tat	aac	ggt	cat	ccg	cct	gat	aac	1632
	Ala	Val	Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Asp	Asn	
			530					535					540				
45	gca	aag	caa	ttt	gtc	gac	tgg	tta	gac	caa	gcg	tct	gct	gat	gaa	gta	1680
	Ala	Lys	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	
		545				550						555					
50	aaa	ggc	gtt	cgc	tac	tcc	gta	ttt	gga	tgc	ggc	gat	aaa	aac	tgg	gct	1728
	Lys	Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Lys	Asn	Trp	Ala	
	560				565				570						575		
55	act	acg	tat	caa	aaa	gtg	cct	gct	ttt	atc	gat	gaa	acg	ctt	gcc	gct	1776
	Thr	Thr	Tyr	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	
				580					585						590		
60	aaa	ggg	gca	gaa	aac	atc	gct	gac	cgc	ggt	gaa	gca	gat	gca	agc	gac	1824
	Lys	Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp				

DE 100 11 723 A 1

gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu 660 665 670	2016	
ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu 675 680 685	2064	5
ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile 690 695 700	2112	10
cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly 705 710 715	2160	15
cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu 720 725 730 735	2208	20
gct cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln 740 745 750	2256	25
tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg cag ctt cgc gca atg Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met 755 760 765	2304	30
gct gct aaa acg gtc tgc ccg ccg cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu 770 775 780	2352	35
ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr 785 790 795	2400	
atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgt gaa atg aaa ttc agc Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser 800 805 810 815	2448	40
gaa ttt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 820 825 830	2496	45
tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser 835 840 845	2544	50
gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile 850 855 860	2592	55
gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys 865 870 875	2640	60
ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu 880 885 890 895	2688	
acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg 900 905 910	2736	65

DE 100 11 723 A 1

ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt 2784
 Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu
 915 920 925
 5 gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat 2832
 Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr
 930 935 940
 10 ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg 2880
 Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr
 945 950 955
 15 ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt 2928
 Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val
 960 965 970 975
 20 cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat 2976
 Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp
 980 985 990
 25 caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct 3024
 Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro
 995 1000 1005
 30 gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg 3072
 Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val
 1010 1015 1020
 35 agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc 3120
 Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly
 1025 1030 1035
 40 cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa 3150
 Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly
 1040 1045
 45 <210> 2
 <211> 1048
 <212> PRT
 <213> Bacillus megaterium
 50 <400> 2
 Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 55 Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile
 20 25 30
 Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val
 35 40 45
 60 Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu
 50 55 60
 65 Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp
 65 70 75 80
 65 Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp
 85 90 95
 Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met

DE 100 11 723 A 1

100	105	110	
Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln 115 120 125			5
Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp 130 135 140			
Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr 145 150 155 160			10
Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser 165 170 175			15
Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn 180 185 190			
Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp 195 200 205			20
Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys 210 215 220			25
Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly 225 230 235 240			
Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr 245 250 255			30
Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu 260 265 270			35
Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln 275 280 285			
Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser 290 295 300			40
Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu 305 310 315 320			
Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys 325 330 335			45
Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu 340 345 350			50
Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly 355 360 365			
Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala 370 375 380			55
Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys 385 390 395 400			60
Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met 405 410 415			
Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp 420 425 430			65
Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala			

DE 100 11 723 A 1

	435	440	445
5	Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu 450 455 460		
	Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr 465 470 475 480		
10	Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr 485 490 495		
	Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln 500 505 510		
15	Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala 515 520 525		
20	Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala 530 535 540		
	Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys 545 550 555 560		
25	Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr 565 570 575		
30	Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys 580 585 590		
	Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp 595 600 605		
35	Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val 610 615 620		
40	Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser 625 630 635 640		
	Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala 645 650 655		
45	Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu 660 665 670		
	Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu 675 680 685		
50	Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro 690 695 700		
55	Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu 705 710 715 720		
	Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Lys Leu Ala 725 730 735		
60	His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr 740 745 750		
65	Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala 755 760 765		
	Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu		

DE 100 11 723 A 1

770	775	780	
Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met 785 790 795 800			5
Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu 805 810 815			
Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser 820 825 830			10
Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val 835 840 845			15
Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala 850 855 860			
Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe 865 870 875 880			20
Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr 885 890 895			25
Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly 900 905 910			
Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly 915 920 925			30
Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu 930 935 940			35
Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu 945 950 955 960			
His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln 965 970 975			40
His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln 980 985 990			
Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala 995 1000 1005			45
Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser 1010 1015 1020			50
Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg 1025 1030 1035 1040			
Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly 1045			55
<210> 3			60
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Künstliche Sequenz			65
<220>			
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer			

<400> 3
gcaggagacg ggttgnnnac aagctggacg 30

5
<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

15
<400> 4
cgtccagctt gtnnncaacc cgtctcctgc 30

20
<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

30
<400> 5
gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaat ccag 34

35
<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

45
<400> 6
ctggatttgc tcgctgnnnc ttgttcattg cttc 34

50
<210> 7
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

55
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

60
<400> 7
gctttgataa aaacttaaag tcaannnctt aaatttgtag g 41

65
<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

70
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

75
<400> 8
cgtacaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc 40

DE 100 11 723 A 1

<210> 9		
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		5
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer		10
<400> 9	37	
gttattaaac acagataaan nngttcaagc ttgtag		
<210> 10		15
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		20
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer		
<400> 10	37	
catcaaagct tgaacnnntt tatctgtggt taataac		25
<210> 11		
<211> 37		
<212> DNA		30
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer		35
<400> 11	37	
gttattaaac acagataaac cgnnncaagc ttgtag		
<210> 12		40
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		45
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer		
<400> 12	37	
catcaaagct tgnnncggtt tatctgtggt taataac		50
<210> 13		
<211> 33		
<212> DNA		55
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer		60
<400> 13	33	
cgaggcgctt ggtnnngtaa cgcgctactt atc		
<210> 14		65
<211> 33		

DE 100 11 723 A 1

<212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 14
 gataagtagc gcgttacnnn accaggcgcc tcg 33

10

<210> 15
 <211> 34
 <212> DNA
 15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

20 <400> 15
 cctgggtcgtg taacgcgcnn nttatcaagt cagc 34

25 <210> 16
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

30 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 16
 35 gctgacttga taannngcgc gttacacgac cagg 34

<210> 17
 <211> 40
 40 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

45 <400> 17
 gctttgataa aaacttannn caagcgctta aatttgtagc 40

50 <210> 18
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

55 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 18
 60 cgtacaaatt taagcgcttg nnntaagttt ttatcaaagc 40

<210> 19
 <211> 30
 65 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 19

ggcgacgaac tannngttct gattcctcag

30

5

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

15

<400> 20

ctgaggaatc agaacnnnta gttcgtcgcc

30

20

Patentansprüche

1. Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase, welche durch ortsspezifische Mutagenese ihres Substrat-bindenden Bereichs im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Substratprofil bei der terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren zeigt. 25
2. Monooxygenase nach Anspruch 1, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
3. Monooxygenase nach Anspruch 2, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, welche wenigstens eine funktionale Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224 und 352-356, mit der Maßgabe, dass mehr als einer dieser Bereiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt. 30
4. Monooxygenase nach Anspruch 3, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäuresequenzbereichen 86-88 und 172-224.
5. Monooxygenase nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eines der folgenden Aminosäuresubstitutionsmuster aufweist: 35
 - a) F87V;
 - b) F87A L188K;
 - c) F87V L188K;
 - d) F87A L188K A74G;
 - e) F87V L188K A74G;
 - f) F87 L188K A74G R47F;
 - g) F87V L188K A74G R47F;
 - h) F87A L188K A74G R47F V26T; oder
 - i) F87V L188K A74G R47F V26T;
- sowie funktionale Äquivalente davon. 45
6. Monooxygenase nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine einzelne der folgenden Aminosäuresubstitutionen aufweist:
 - a) V26T,
 - b) R47F,
 - c) S72G,
 - d) A74G,
 - e) F87V,
 - f) L188z, worin z für eine Aminosäure, ausgewählt unter K, R, W, Q, N, G, A und S steht; und
 - g) M354T;
 sowie funktionale Äquivalente davon. 55
7. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Monooxygenase nach einem der vorherigen Ansprüche.
8. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 7 umfasst.
9. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt nach Anspruch 8.
10. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 9. 60
11. Mikroorganismus nach Anspruch 10, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*.
12. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 10 oder 11 in Gegenwart eines Kulturmediums das die wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat kultiviert; oder
 - a2) ein Reaktionsmedium, enthaltend wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat, mit einem Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 6 inkubiert; und
 65

b) das gebildete hydroxylierte Produkt aus dem Medium isoliert.

13. verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C₈-C₃₀-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C₈-C₁₂-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante gemäß Anspruch 5 einsetzt.

15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C₁₂-C₃₀-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante ausgewählt unter den Einfachmutanten F87A, F87V, V26T, S72G, A74G und M354T, und den Mehrfachmutanten

F87A L188K A74G R47F;

F87V L188K A74G R47F;

F87A L188K A74G R47F V26T; oder

F87V L188K A74G R47F V26T;

einsetzt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalents durchführt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Elektronendonator oder das Reduktionsäquivalent ausgewählt ist unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen



Fig. 1

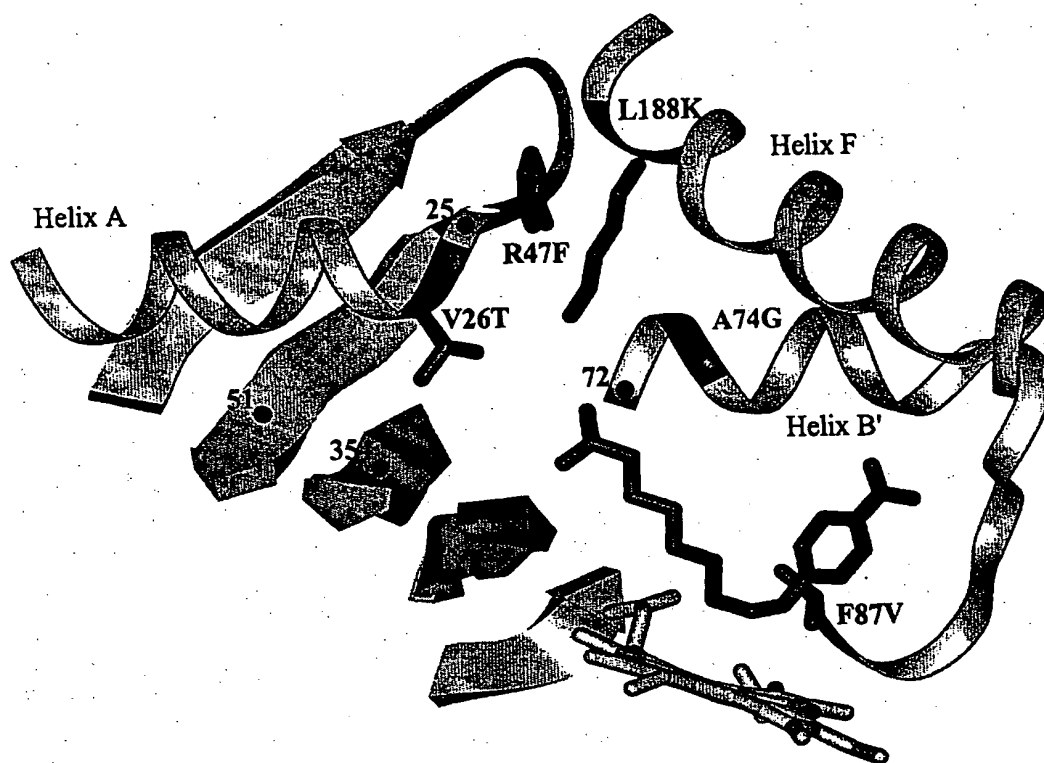


Fig.2

BEST AVAILABLE COPY